

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0143-04

白细胞介素 24 的研究进展

郑月娟¹综述;曹雪涛²审阅(1. 浙江大学免疫研究所, 杭州 310031; 2. 第二军医大学免疫学研究所, 上海 200433)

[摘要] 白细胞介素 24(Interleukin-24, IL-24)又称为黑色素瘤分化相关基因 7(melanoma differentiation-associated gene 7, mda-7),它主要由 CD3⁻ T 淋巴细胞和单核细胞表达,属分泌型蛋白,由 206 个氨基酸组成,属于 IL-10 家族的成员。mda-7/IL-24 作为细胞因子能诱导多种其它细胞因子的表达;作为肿瘤抑制基因能选择性诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长,以及引起黑色素瘤细胞末端分化。在肿瘤免疫治疗中具有应用价值。

[关键词] 白细胞介素 24; 黑色素瘤分化相关基因 7; 凋亡; 肿瘤治疗

[中图分类号] R392 [文献标识码] A

白细胞介素是由淋巴细胞、单核细胞或其他非单核细胞产生的细胞因子,在细胞间相互作用、免疫调节、造血以及炎症过程中起重要调节作用。20 世纪 80 年代以来,由于基因工程、细胞工程研究的飞速发展,尤其是近几年生物信息学和 EST 数据库的发展使得许多新的细胞因子及其受体基因不断被发现,并对各种细胞因子产生来源、分子结构和基因、相应的受体、信号转导、生物学功能以及与临床的关系进行了大量的研究,使该领域成为免疫学一个十分活跃的研究热点。

白细胞介素 24(Interleukin-24, IL-24)原先被命名为黑色素瘤分化相关基因 7(melanoma differentiation-associated gene 7, mda-7),是 1995 年发现的一种新型细胞因子。体外培养的人黑色素瘤细胞,经过人成纤维细胞干扰素(IFN- β)和蛋白激酶 C 的激活剂, mezerein (MEZ) 共同处理,这些细胞将失去增生和分化能力。1995 年,美国的哥伦比亚大学的 Jiang 等^[1]把从增生活跃的人类 HO-1 黑色素瘤细胞产生的 cDNA 文库和经 IFN- β 和 MEZ 共同处理过的 HO-1 细胞的 cDNA 文库进行减数杂交,首次发现了后者有一新的黑色素瘤分化相关 cDNA,被命名为黑色素瘤分化相关基因 7(mda-7)。2001 年,MDA-7 因其分子结构,基因定位和细胞因子样特性而被正式命名为白介素 24(IL-24)^[2]。本文对 mda-7/IL-24 的结构、表达和功能的研究进展作一综述。

1 IL-24 的结构及染色体定位

人 mda-7/IL-24 基因定位于 1 号染色体长臂 32 区的一个 195 kb 大小的基因簇中^[2],属于 IL-10 家族的成员,其它 IL-10 家族的成员 IL-19 和 IL-20 也定位于这个基因簇^[3], mda-7 基因由 7 个外显子和 6 个内含子组成^[4], mda-7 cDNA 全长为 1 718 bp,其主要阅读框架编码了一个 206 个氨基酸组成的新蛋白,分子量为 23.8 kD。MDA-7/IL-24 蛋白是一种 α -螺旋的分泌蛋白^[1,5]。但是无论 PBMCs 分泌的 IL-24 还是稳定转染的 293T 细胞分泌的 IL-24-His 分子量都接近

35 kD,那是因为人 IL-24 的氨基端糖基化的结果^[6]。

新近发现小鼠的 IL-24 的同源分子是一种 Th2 细胞特异的细胞因子,被称为(IL-4 induced secreted protein, FISP),是 IL-4 诱导的分泌蛋白^[4]。大鼠的 mda-7/IL-24 的同系物是 C49a(Mob5),与人 IL-24 有 78% 的核苷酸同源性, C49a 与伤口愈合过程有关^[4,7]。正因为 mda-7/IL-24 的同源分子在不同物种上都有表达和分泌,进一步说明了这种分子的细胞因子特性^[2]。

2 IL-24 的表达及其调节

研究表明 MDA-7 蛋白可在正常黑色素细胞和早期黑色素瘤细胞中表达,这种蛋白在皮肤平滑肌中也有表达。此外, Zhang 等^[7]在几个结肠癌标本中也观察到了 mda-7 的高水平表达,这个现象和我们通常认为 mda-7 的抗肿瘤作用不符。然而,在黑色素瘤的恶化过程中 mda-7 表达逐渐减少,在转移性黑色素瘤中几乎观察不到 mda-7 的表达^[8]。作为黑色素细胞发展成为转移性黑色素瘤的进展过程中, mda-7 表达的作用逐渐减少。然而,用 IFN- β 和蛋白激酶 K 激活剂 MEZ 治疗人转移性黑色素瘤细胞导致了 mda-7 mRNA 和蛋白的表达增加,使肿瘤细胞丧失永生性,并诱导末端分化^[4]。有研究报道,在这种联合处理后的分化细胞中, mda-7 基因从胞浆中转移到核内^[5],然而,目前没有有力的证据表明 mda-7 基因在核内的定位,相反,在正常黑色素细胞和高表达该基因的黑色素瘤细胞中 mda-7 广泛地定位于胞浆内^[4]。 Mardireddi 等^[4]的研究表明在人黑色素瘤的末端分化过程中, mda-7 表达的调节主要是在转录后水平。

在人的外周血单个核细胞(peripheral blood mononucleus cell, PBMC)中,主要是活化的 CD3⁻ T 淋巴细胞和单核细胞能够表达 mda-7/IL-24^[2]。 Gaudell 等^[2]实验证明 mda-7/IL-24 是由 PHA 激活的人淋巴细胞 CD56⁺ 和 CD19⁺ 2 个亚群表达的一种分泌蛋白,而 IL-10 使之表达减少^[9]。 Wang 等^[6]证明 ras 原癌基因通过促分裂素活化的蛋白激酶途径诱

导出 IL-24, 在肿瘤的转化过程中能以自分泌和旁分泌的形式与细胞表面受体结合。Garn 等^[9]用 LPS 和白介素 4 刺激大鼠的肺泡巨噬细胞和 NR8383 细胞发现 mda-7/IL-24 在 mRNA 水平上有表达, 而 TNF- α 刺激无效。在 NR8383 细胞中, 不加刺激或者 IL-4 刺激后都有 IL-24 的蛋白表达。人血单核细胞经 LPS 刺激后观察到 IL-24 mRNA 表达的大幅度上调, 而 IL-10 刺激则减少其表达。另外, 用 A 型流感病毒 A/PR/8 感染人的单核细胞导致了 IL-24 的 mRNA 表达升高。总之, Garn 等^[9]的数据表明在刺激的或感染的大鼠和人的单核巨噬细胞系中有 IL-24 的表达。Wang 等^[6]实验证明 ConA 刺激 PBMCs 快速分泌 IL-24, 但是 LPS 对 IL-24 的产生只有轻微的作用。

3 IL-24 受体及其信号传导

到目前为止, 所知的 IL-10 家族新成员(IL-19, IL-20, IL-22, mda-7/IL-24, IL-26/AK155)的受体都属于 II 型细胞因子受体家族^[4]。这些受体大都是跨膜糖蛋白, 它们的细胞外部是由大约 220 个氨基酸组成 2 个串联的三型纤连素的功能区, 并有多个对二级结构非常重要的保守的氨基酸位点。通常, 当配体和 2 个特殊的受体链结合以后, R1 和辅助性的 R2 相聚合, 形成最后功能性的受体复合物, 和配体结合后将会激活细胞内 Jak-STAT 途径, 调节相关基因的表达, 产生相关的生物学效应。而 mda-7/IL-24 受体是 2 个异二聚体, 分别是 IL-22R1/IL-20R2 和 IL-20R1/IL-20R2, 后者也是 IL-20 的受体。Wang 等^[6]实验证明 COS 细胞转染了 IL-24 2 个异二聚体受体的任何一个能以相当的亲和力与饱和度和 IL-24 结合, 并激活 STAT3 途径。实际上, MDA-7/IL-24 能结合到 IL-22R1 和 IL-20R2^[3,6], 导致 STAT3 磷酸化^[4]。

4 IL-24 的生物学功能

4.1 免疫学功能

经过 Ad-mda-7 转染的 HEK293 细胞可分泌 mda-7/IL-24 蛋白, Gaudell 等^[2]观察了 mda-7/IL-24 对人 PBMC 作用引起细胞因子分泌的情况, 用 ELISA 观察到 48 h 以内, mda-7/IL-24 诱导了高水平 IL-6, TNF- α 和 IFN- γ 的分泌和低水平 IL-1 β , IL-12 和 GM-CSF 分泌。

虽然 mda-7/IL-24 和 IL-10 属于同一个家族, 但是它们对人 PBMC 的作用是相拮抗的, 即 IL-10 抑制了 IL-24 诱导的细胞因子的分泌。然而, 两者对人 PBMC 都不表现出生长因子的作用^[2]。

因为白细胞可以刺激产生 mda-7/IL-24 并对其有反应而分泌二级细胞因子。mda-7/IL-24 的这种表达形式和显著的功能, 显示它是名副其实的白细胞介素的新成员^[2]。

4.2 抗肿瘤作用

目前已有的许多实验表明, mda-7/IL-24 蛋白具有较明显的抗肿瘤作用, 能选择性地诱导多种肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤生长, 以及引起黑色素瘤细胞末端分化。具体来说, IL-24 可以诱导 GADD153, GADD45a 和 GADD34 等 GADD 家

族的成员较高表达, 而对 GADD45 γ 表达的诱导作用则较低。

4.2.1 通过 p38MAPK 途径激活 GADD 家族基因

Sarkar 等^[10]研究证明 mda-7/IL-24 通过复制缺陷型腺病毒将 mda-7 基因(Ad-mda-7)介导入不同的人类肿瘤细胞中引起凋亡, 而对正常的成纤维细胞和上皮细胞没有毒副作用。进一步研究表明, 在这些细胞中, GADD 表达量呈时间和剂量依赖性, 这从 mRNA 和蛋白水平都可证明, 而且用 GADD 基因的反义序列可抑制 Ad-mda-7 诱导的凋亡。另外, 研究人员还发现, 在使用 Ad-mda-7 后, p38 分裂素激活蛋白激酶(MAPK)的磷酸化增加, 热休克蛋白 27(HSP27)增加, 而且用 p38MAPK 的选择性抑制剂 SB203580 可抑制 Ad-mda-7 诱导的凋亡。从以上事实可以得出, Ad-mda-7 增加 p38MAPK 的磷酸化, 从而使得 GADD 家族基因过表达, 而使得肿瘤细胞凋亡。

4.2.2 mda-7 可改变凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的比例

mda-7 促进肿瘤细胞凋亡的作用机理与视网膜母细胞瘤蛋白(RB)无关, 而是与 BAX 蛋白表达的上调有关^[4]。Saeki 等研究了体内非小细胞性肺癌细胞中诱导 mda-7 基因过量表达并研究它对肿瘤生长的作用。在 p53 野生型 A549 和 p53 缺失型 H1299 等皮下肿瘤, Ad-mda-7 介导的 mda-7 的过量表达通过诱导凋亡明显抑制了肿瘤生长。另外, 在表达 mda-7 的肿瘤中发现了 CD31/PECAM 的表达减少和 AP02/TRAIL 的表达增加, 并导致了细胞群体中 G₂ 期细胞/M 期细胞的比值增高, 减少了肿瘤转移, 但在正常人肺成纤维细胞中没有得到类似结果^[2,11]。在野生型 P53 肿瘤细胞株中, P53, Bax, Bak 蛋白表达都上调了, 但是在 P53 缺失型细胞中表达没有上调, 这表明 Bax 和 Bak 蛋白诱导是需要完整的 p53 途径的。尽管这样, 但是, 在试验的 3 个肿瘤细胞株中, 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(cysteinyl aspartate-specific proteinases, Caspase)级链的激活和多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶[poly(ADP-ribose)polymerase, PARP]的分裂与 P53 的突变状态无关。这些结果表明, Ad-mda-7 诱导人肺癌细胞凋亡是通过多种途径的^[11]。

Lebedeva 和 Su 等^[12-13]用 Ad-mda-7 转染转移性黑色素瘤细胞, 导致了 mda-7 mRNA 暂时性升高, 以及多数黑色素瘤细胞/黑色素瘤细胞中 MDA-7 蛋白的表达和分泌, 也导致了细胞群体中 G₂ 期细胞/M 期细胞的比值增高, 并增加了凋亡前蛋白(Bax, Bak)和抗凋亡蛋白(Bcl-2, Bcl-XL)的比例^[4,12]。Madireddi 等^[4]研究表明在黑色素瘤细胞中通过 DNA 转染后 mda-7 的生理水平的表达可以抑制肿瘤生长, 而通过 Ad-mda-7 引起的超过生理水平的表达可以诱导黑色素瘤细胞凋亡。Lebedeva 等利用 Ad-mda-7 转染了多种组织来源的人类肿瘤细胞, 发现表达的 mda-7 可发挥生长抑制和诱导凋亡的作用, 并且对正常的人上皮细胞和成纤维细胞没有毒害作用^[5,11,13-14]。在体内研究, Ad-mda-7 转染的体外肿瘤细胞增生抑制和内皮细胞分化等研究中, 都有证据表明 Ad-mda-7 作为多种方式的抗肿瘤因子, 同时具有凋亡诱导作用和抗血管生成等抗肿瘤作用^[15]。

4.2.3 Ad-mda-7 可上调 PKR 诱导凋亡

Paster 等^[16]报导 Ad-mda-7 诱导并活化双链 RNA 依赖性蛋白激酶(double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR),它能使真核细胞翻译启动因子 2(eukaryotic translation initiation factor 2, eIF-2)的 α 亚单位磷酸化,并且能诱导肺癌细胞的凋亡。用丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂 2-氨基嘌呤(2-aminopurine, 2-AP)可以抑制 Ad-mda-7 诱导的 PKR 的活化, eIF-2 α 的磷酸化和凋亡。Jiang 和 Su 等^[1,13]发现在人类黑色素瘤细胞中 mda-7 表达增加有抗增生和引起细胞末端分化的作用。他们还通过减数杂交发现 mda-7 基因与诱导人黑色素瘤细胞不可逆的生长抑制,肿瘤逆转等有关^[17]。mda-7 在黑色素瘤的演变过程中有一种潜在的抑制作用,机制尚未明了。已经发现,比起转移性黑色素瘤来说,培养的正常黑色素细胞中 mda-7 mRNA 则处在一高水平状态。而且,mda-7 的信号水平与人黑色素瘤的进程呈负相关,是一个负性调节因子,表明了 mda-7 基因导入可能是转移性黑色素瘤基因治疗的新方法^[1,12,17]。

Saeki 等^[11]从一个人黑色素瘤细胞株 H0-1 中克隆得到的 mda-7,作用于体外培养的乳腺癌细胞,导致了肿瘤细胞选择性抑制,并失去了体外肿瘤生长能力,也抑制了裸鼠体内乳腺癌细胞的生长,其机制与它引起凋亡前因子 Bax 上调以及 Bax: Bcl-2 蛋白比例上升(后者为凋亡抑制蛋白)^[18,19]。

这些结果表明在 Ad-mda-7 介导的凋亡的过程中,PKR 的活化和它的下游靶分子可能是一个重要途径^[16]。

4.2.4 Ad-mda-7 联合针对 K-ras 原癌基因的反义硫代磷酸寡核苷酸治疗胰癌

不同于其他肿瘤,胰腺癌细胞能够明显躲过 Ad-mda-7 诱导的生长抑制和凋亡。相反,采用联合 Ad-mda-7 和反义硫代磷酸寡核苷酸(antisense phosphorothioate oligonucleotides)治疗胰癌可诱导明显的生长抑制并通过凋亡作用减少细胞活力,后者主要是针对 K-ras 原癌基因的(该基因在 85% ~ 95% 的胰癌病例中有突变的基因)。在 K-ras 突变胰癌中,这两者合用抑制了体外克隆的形成并抑制了裸鼠体内胰癌的生长。这些均表明了此种组合方法包括肿瘤特别凋亡诱导基因和使原癌基因失活的策略,可能为发展一种有效的治疗胰癌的方法提供了基础^[13]。

综上所述,Ad-mda-7 能够通过多途径有选择性地杀伤多种来源的肿瘤细胞,有望成为用于肿瘤基因治疗的一种新的候选基因^[4,11,14,20]。

5 结语和展望

生物信息学和基因组学的飞速发展促成了新的细胞因子及其受体的不断发现,细胞因子的研究成为一个涉及生物学多方面的进展迅猛的热门领域。细胞因子在免疫细胞的分化、发展和免疫应答的调控中起着重要作用,而且在肿瘤生长、侵袭、转移过程中发挥着关键作用。mda-7/IL-24 作为新近发现的 IL-10 家族成员,对肿瘤细胞有选择性诱导凋亡作用和肿瘤抑制作用,以及诱导黑色素瘤的末端分化和抑制

转移的作用。另外,还通过相应受体 IL-22R1/IL-20R2 和 IL-20R1/IL-20R2 可发挥细胞因子的作用。mda-7/IL-24 是有望成为肿瘤基因治疗的重要因子。但是,目前对 IL-24 的认识刚刚开始,有许多问题有待进一步探索,随着对其研究的深入,相信会对该因子的结构和功能有进一步的深入阐明,而且可能为肿瘤、感染等疾病的治疗提出新的思路和策略。

[参 考 文 献]

- [1] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, *et al.* Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression [J]. *Oncogene*, 1995, 11(12): 2477-2486.
- [2] Caudell EG, Mumm JB, Prindexter N, *et al.* The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 [J]. *J Immunol*, 2002, 168: 6041-6046.
- [3] Wolk K, Kunz S, Khusru A, *et al.* Cutting Edge: Immune cells as sources and targets of IL-10 family members? [J]. *J Immunol*, 2002, 168: 5397-5402.
- [4] Sergei V. Kotenko. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: Related, but to what extent? [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2002, 13: 223-240.
- [5] Jiang H, Su ZZ, Lin JJ, *et al.* The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9160-9165.
- [6] Wang M, Tan Z, Zhang R, *et al.* Interleukin-24(MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(9): 7341-7347.
- [7] Zhang R, Tan Z, Liang P. Identification of a novel ligand-receptor pair constitutively activated by ras oncogenes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 24436-24443.
- [8] Madireddi MT, Dent P, Fisher PB. AP-1 and C/EBP transcription factors contribute to mda-7 gene promoter activity during human melanoma differentiation [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 185(1): 36-46.
- [9] Garn H, Schmidt A, Grau V, *et al.* IL-24 is expressed by rat and human macrophages [J]. *Immunobiology*, 2002, 205(3): 321-334.
- [10] Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, *et al.* Mda-7(IL-24) mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 10054-10059.
- [11] Saeki T, Mhashilkar A, Chada S, *et al.* Tumor-suppressive effects by adenovirus-mediated mda-7 gene transfer in non-small cell lung cancer cell *in vitro* [J]. *Gene Therapy*, 2000, 7(23): 2051-2057.
- [12] Lebedeva IV, Su ZZ, Chang Y, *et al.* The cancer growth suppression gene mda-7 induces apoptosis selectively in human melanoma cells [J]. *Oncogene*, 2002, 21(5): 708-718.
- [13] Su Z, Lebedeva IV, Gopalkrishnan RV, *et al.* A combinatorial approach for selectively inducing programmed cell death in human aneuploid cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(18): 10332-10337.
- [14] Mhashilkar AM, Schirock RD, Hindi M, *et al.* Melanoma differentiation associated gene-7(mda-7): A novel anti-tumor gene for cancer gene therapy [J]. *Mol Med*, 2001, 7(4): 271-282.

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0146-03

自杀基因在肝癌治疗中的应用现状

苏 丹¹综述; 项 涛¹, 金英花²审阅 (1. 四川大学华西医学中心基础与法医院解剖教研室, 成都 610041; 2. 清华大学生物科学与技术系结构生物实验室, 北京 100084)

[摘要] 目前, 在自杀基因治疗肝癌的研究中, 通过联合基因治疗, 受体介导定位、改变酶特性, 寻找新的自杀基因系统, 以及选择不同用药策略和途径等, 方法将自杀基因高效导入靶细胞, 并使之表达, 从而增强特异性杀伤肝脏肿瘤细胞作用。临床应用前景广阔。

[关键词] 自杀基因; 基因治疗; 肝肿瘤

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A

自杀基因因其高度特异性的负选择标记, 杀伤多种耐药性肿瘤细胞等优势成为肝癌基因治疗的研究热点。其杀伤肿瘤细胞的分子机制和具体类型已经有大量文献报道, 本文就目前自杀基因在肝癌治疗中的应用现状做一综述。

一段时间内, 研究者主要使用各种载体和不同的自杀基因系统组合, 进行肝癌的基因治疗研究。有利用逆转录病毒载体和 HSV-tk/GCV(单纯疱疹病毒-胸腺嘧啶脱氧核苷酸激酶/更昔洛韦) 系统, 通过体内直接注入法治疗鼠肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC); 还有利用腺病毒载体和 CD/5-FC 作用鼠 HCC 细胞系; 也有使用质粒为载体的 CD/5-FU 作用大鼠转移性肝癌细胞系; 以及通过鼠肝动脉将载有 HSV/tk 的腺病毒直接注入肿瘤, 都取得了明显的抑制肿瘤生长和杀伤肿瘤细胞的作用。Gnant 等^[1]比较了 VZV-CD/5-FC(水痘带状疱疹病毒-胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶) 和 VZV-HSV/tk 两种系统各自对大鼠肝癌的疗效后, 提出 VZV-HSV/TK 具有较好的疗效和临床应用前景。但是总体上单一的自杀基因治疗肝癌的效果并不十分理想。于是人们又进行了一系列的增强自杀基因治疗肝癌有效性和特异性的研究。

1 联合自杀基因治疗

联合细胞因子与自杀基因治疗大鼠转移性肝癌模型已

经取得了明显的疗效。Drozdziak 等^[2]利用了 IL-12 和 tk/GCV 联合疗法, 通过 IL-12 活化细胞毒性 T 细胞和自然杀伤细胞, 从而增强机体抗肿瘤免疫性, 取得了较好的疗效, 并且证明了在治疗小鼠 HCC 中, 联合治疗有更好的抑制肿瘤生长的作用。Kawashita 等^[3]使用脂质体将自杀基因 tk 转入经过放射线照射的原发性肝癌细胞中, 结果发现, 经照射过的细胞对药物呈高敏感性。Kanazawa 等^[4]利用 γ 射线照射, 可以增强腺相关病毒互补链的合成, 以它为载体将 HSV/tk 转入肿瘤细胞并配合放疗, 可以提高杀伤肿瘤细胞疗效。Nakamura 等^[5]利用滤过性病毒溶瘤作用与自杀基因联合治疗肝癌, 在单纯疱疹病毒和 CD/5-FU 联合作用下, 增强了“旁观者效应”, 延长了小鼠的存活时间。Kenneth 等^[6]构建双自杀基因 CD/5-FC 与 HSV-1 tk/GCV 联合应用, 实验表明该系统杀伤肿瘤作用强于单个自杀基因系统, 再加上放射性疗法, 可以最终使肿瘤完全消失。Sakai 等^[7]利用腺病毒载体分别将 tk/GCV 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1,) 同时转入动物 HCC 中, MCP-1 通过增加肿瘤组织中的巨噬细胞活性和数量来增强自杀基因的杀伤肿瘤作用。

2 特异性受体介导自杀基因治疗

目前, 作为转基因的载体设计已经有了很大的改进, 这

[15] Saeki T, Mhashilkar A, Swanson X, *et al.* Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression *in vivo*[J]. *Oncogene*, 2002, 21(29): 4558-4566.

[16] Paster A, Vorburger SA, Barber GN, *et al.* Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7(mda7) induces apoptosis of lung cancer cells via up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase(PKR) [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(8): 2239-2243.

[17] Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Mhashilkar AM, *et al.* Down-regulated melanoma differentiation associated gene(MDA-7) expression in human melanomas [J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(1): 54-59.

[18] Reed JC, Zha H, Aime-Sempe C, *et al.* Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins, regulators of programmed cell death [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 406: 99-112.

[19] Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, *et al.* Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7834-7838.

[20] Ellerhorst JA, Prieto VG, Ekmekcioglu S, *et al.* Loss of mda-7 expression with progression of melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(4): 1069-1074.

[收稿日期] 2003 - 03 - 02 [修回日期] 2003 - 05 - 20

对有效控制目的基因表达是非常重要的。很多自杀基因在病毒启动子的调控下转录表达是非常有效的,但是由于存在组织毒性作用被严格限制使用。利用细胞或组织特异性启动子能够使目的基因在特定的靶细胞中表达,从而最大程度地减少对正常组织的毒副作用。但是许多肿瘤特异性启动子对目的基因的表达水平较低,不能达到治疗所需要的浓度。研究表明,一种与逆转录病毒特异性结合的受体,鼠阳离子氨基酸转运因子-1(mouse cationic amino acid transporter-1, MCAT-1),可以使逆转录病毒携带的目的基因在人细胞中特异性的表达。Uto 等^[8]利用两步基因转导法提高了逆转录病毒载体转导效率,先在以腺病毒或腺相关病毒为载体 HCC 特异性启动子 AFP 的作用下,在靶细胞膜表面先表达 MCAT-1 受体,然后加入装有强启动子的目的基因逆转录病毒载体,使其与 MCAT-1 特异性的结合,将目的基因转入靶细胞中。这样就相对提高了目的基因的转录效率。

3 改变自杀基因系统的酶特性

前体药物的组织毒性作用限制了杀伤肿瘤产物的有效浓度。为了减少副作用,增强疗效,Kokoris 等^[9]针对 tk/GCV 系统利用半随机突变方法,得到的突变产物中筛选出 7 个突变体,其中突变体 SR39 与 SR26 活性较野生型分别增加 14 倍和 124 倍。这样就极大地减少了前体药物的浓度和对肝组织的毒性作用,并保证了治疗需要的药物剂量。Wybraniec 等^[10]在 CD 基因两端加入 HSV-1 外壳蛋白 VP22 基因通过腺病毒转入 HCC 细胞中,通过 VP22 使药物有效地向周围细胞转运,增强了“旁观者效应”。

4 改变自杀基因系统给药策略及途径

Engelmann 等^[11]在研究 tk/GCV 自杀基因系统治疗肝癌时,将前体药物 GCV 装入脂质体(lip-GCV)中进行治疗,发现 lip-GCV 经过静脉注射后,能很快降低药物在外周血浆中的浓度和提高在肝脏血中的药物浓度。并且比单纯注射 GCV 更有效的杀伤 TK⁺ 细胞。Gnant 等^[12]通过研究不同的给药途径来观察自杀基因在转移性肝癌细胞中的表达,发现通过门静脉和腹腔注射的目的基因表达效率较外周静脉注射的有显著提高。而门静脉与腹腔注射之间无显著差异。Baque 等^[13]将表达 CD 的质粒直接注入鼠转移性肝癌瘤体内,然后用 5-FU 治疗,肿瘤体积明显缩小。Gerolami 等^[14]比较了在鼠 HCC 中直接注射和经肝动脉注射 tk/GCV 的治疗效果,发现了较大的肿瘤体中采取直接注入更能有效发挥药物杀伤作用,而对大量的小肿瘤结节则可采取经动脉注射法。

5 寻求新的载体

病毒性载体能够将目的基因高效转入宿主细胞并有效表达目的基因的能力,但是它具有较大的组织毒性作用、插入突变、免疫原性以及病毒侵袭性恢复等缺点也限制了其临床应用。而非病毒性载体由于转导效率低下也很难广泛使

用。Iwai 等^[15]利用复制缺陷型单纯疱疹病毒 QOZ/HG 和 TOZ.1 为载体,能有效的将 tk 转入癌细胞中。Maruyama-Tabata 等^[16]在质粒的基础上增加了 EB 病毒的核抗原 1 基因(EBV nuclear antigen 1 gene)和 EB 病毒 Orip 区,即潜伏期病毒 DNA 复制起始点的两个区域,这就是 EBV-based plasmid。它具有病毒和质粒两者的优点,安全性高,转导效率高。Iwai 等^[17]在 V-based plasmid 的基础上,又与多聚乙亚胺(polyethylenimine, PEI)结合使用,发现具有更高的转导效率。PEI 是近年来发现的一个多聚阳离子型的 DNA 载体,具有较强的缓冲能力。DNA/PEI 复合物内吞进入溶酶体后,能够避免 DNA 在酸性条件下的降解作用,因此,具有较高的表达效价。Hasegawa 等^[18]使用日本血凝病毒-质粒(HVJ-liposomes),利用病毒外壳上含有的 HN 和 F 糖蛋白促进质粒和细胞的融合,将 HSV/tk 转入 HCC 细胞,并通过多次注射增强其杀伤肝癌细胞的作用,在 GCV 浓度为 100 g/ml, 20% 的细胞被转染的条件下,有 1/3 的肿瘤细胞发生死亡。

6 构建高效特异性启动子

使用特异性的启动子将自杀基因转导到特定的组织和细胞中的方法能够显著增强自杀基因的临床应用前景。Gerolami 等^[14]将 tk 基因分别装入巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子和甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)启动子的腺病毒中,然后转入鼠 HCC 中,发现 Ad. CMVtk 组织毒副作用大,而 Ad. AFPtk 具有较好的肿瘤特异性。但是,在 AFP 阴性或少量表达的肝脏肿瘤细胞中,tk 的表达量将减少。Ido 等^[19]构建了一个含有人类内皮血管生长因子、缺氧反应因子(hypoxia responsive element)与 AF0.3 启动子融合的混合启动子,并特异性在低 AFP 肝细胞中表达。Qiao 等^[20]在肝癌细胞中建立了二元启动子系统来增强目的基因特异性高效表达。其中,肿瘤细胞特异性的癌胚抗原启动子(CEA promoter)控制一种合成转录因子,该因子是由单纯疱疹病毒 VP16 的转录活性区域与酵母菌蛋白 GLA4 的 DNA 结合区域联合构成,编码的 GLA4/VP16 结合蛋白质与启动子的 5 个 GLA4 结合区结合,又可激活下游由 TATA 启动子控制的自杀基因 HSV/tk。从而达到特异性和高效性的统一。结果显示,该系统不仅转录活性高,并且对肝组织的组织毒性作用较常规方法要小。Cao 等^[21]将 AFP 增强子导入 HCC,以逆转录病毒为载体,在磷酸甘油酸激酶启动子的控制下,在肝癌细胞中特异性表达 HSV/tk。该系统在肝细胞中表达效率远高于无 AFP 增强子的载体系统。Majumdar 等^[22]利用末端转移酶启动子控制 tk 的表达,通过腺病毒转入肿瘤细胞,具有良好的肿瘤特异性,并对肝细胞毒性较小。

7 寻找新的自杀基因系统

目前发现在治疗 HCC 中,使用嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNP)/氟达拉滨(fludarabine)系统比 HSV/tk 系统具有更强的“旁观者效应”。Krohne 等^[23]从诱导癌细胞凋亡的机制方

面比较了两种系统的作用。实验表明,在 P53⁺ 癌细胞中,两者最终的疗效相当,但是 PNP/fludarabine 在诱导细胞凋亡早期,能够迅速使大量癌细胞凋亡。而在 P53⁻ 的癌细胞中,PNP/fludarabine 明显优于 HSV/tk,因为前者是不依赖 P53 诱导细胞凋亡的。在研究植物防御昆虫的氰化物生成系统时,发现八仙花属和非洲马铃薯等植物含有一种称为 linamarase 的酶,这是一种生氰的 β 糖苷酶 (a cyanogenic beta-glucosidase),能够将底物亚麻苦甙 (Linamarin) 最终分解成葡萄糖、酮和氰化物。Cortes 等^[24] 就利用 linamarase/linamarin (lis/lin) 这种新的自杀基因系统产生的氰离子起到杀伤肿瘤细胞,并且观察到明显的“旁观者效应”。

综上所述,利用自杀基因治疗肝癌无疑有美好应用前景。通过实验研究,不断地增强抗肿瘤细胞特异性和基因表达的高效性,并且尽可能减少其毒副作用。虽然,还有很多作用机制尚不明确,但是随着对肿瘤发病机制研究的深入和分子生物学相关技术的不断发展,相信利用自杀基因治疗肝癌必将成为一种有效的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Gnant MF, Puhlmann M, Alexander HR, *et al.* Systemic administration of a recombinant vaccinia virus expressing the cytosine deaminase gene and subsequent treatment with 5-fluorocytosine leads to tumor-specific gene expression and prolongation of survival in mice[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 3396-403.
- [2] Drozdziak M, Qian C, Xie X, *et al.* Combined gene therapy with suicide gene and interleukin-12 is more efficient than therapy with one gene alone in a murine model of hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2000, 32: 279-286.
- [3] Kawashita Y, Ohtsuru A, Kaneda Y, *et al.* Regression of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 1509-1519.
- [4] Kanazawa T, Urabe M, Mizukami H, *et al.* Gamma-rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8: 99-106.
- [5] Nakamura H, Mullen JT, Chandrasekhar S, *et al.* Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5447-5452.
- [6] Kenneth R, Mark W, Dell P, *et al.* Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization[J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11: 67-76.
- [7] Sakai Y, Kaneko S, Shimizu M, *et al.* Enhanced anti-tumor effects of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system by codelivering monocyte chemoattractant protein-1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8: 695-704.
- [8] Uto H, Ido A, Hirono S, *et al.* Hepatoma-specific gene therapy through retrovirus-mediated and targeted gene transfer using an adenovirus carrying the ecotropic receptor gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265: 550-555.
- [9] Kokoris MS, Black ME. Characterization of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclov-

- ir or acyclovir activity[J]. *Protein Sci*, 2002, 11: 2267-2272.
- [10] Wybranietz WA, Gross CD, Phelan A, *et al.* Enhanced suicide gene effect by adenoviral transduction of a VP22-cytosine deaminase (CD) fusion gene[J]. *Gene Ther*, 2001, 8: 1654-1664.
- [11] Engelmann C, Panis Y, Bolard J, *et al.* Liposomal encapsulation of ganciclovir enhances the efficacy of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase suicide gene therapy against hepatic tumors in rats [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 1545-1551.
- [12] Gnant MF, Puhlmann M, Bartlett DL, *et al.* Regional versus a systemic delivery of recombinant vaccinia virus as suicide gene therapy for murine liver metastases[J]. *Ann Surg*, 1999, 230: 352-60; discussion 360-361.
- [13] Baque P, Pierrefite-Carle V, Gavelli A, *et al.* Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats. *Hepatology*, 2002; 35: 1144-1152.
- [14] Gerolami R, Cardoso J, Lewin M, *et al.* Evaluation of HSV-tk gene therapy in a rat model of chemically induced hepatocellular carcinoma by intratumoral and intrahepatic artery routes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291: 855-860.
- [15] Iwai M, Harada Y, Ishii M, *et al.* Suicide gene therapy of human hepatoma and its peritonitis carcinomatosis by a vector of replicative-deficient herpes simplex virus[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 993-1001.
- [16] Maruyama-Tabata H, Harada Y, Matsumura T, *et al.* Effective suicide gene therapy *in vivo* by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine[J]. *Gene Ther*, 2000, 7: 53-60.
- [17] Iwai M, Harada Y, Tanaka S, *et al.* Polyethylenimine-mediated suicide gene transfer induces a therapeutic effect for hepatocellular carcinoma *in vivo* by using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291: 48-54.
- [18] Hasegawa H, Shimada M, Yonemitsu Y, *et al.* Preclinical and therapeutic utility of HVJ liposomes as a gene transfer vector for hepatocellular carcinoma using herpes simplex virus thymidine kinase[J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8: 252-258.
- [19] Ido A, Uto H, Moriuchi A, *et al.* Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: Selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 3016-3021.
- [20] Qiao J, Doubrovin M, Sauter BV, *et al.* Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy[J]. *Gene Ther*, 2002, 9: 168-175.
- [21] Cao G, Kuriyama S, Gao J, *et al.* Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promoter[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37: 140-147.
- [22] Majumdar AS, Hughes DE, Lichtsteiner SP, *et al.* The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters[J]. *Gene Ther*, 2001, 8: 568-578.
- [23] Krohne TU, Shankara S, Gelssler M, *et al.* Mechanisms of cell death induced by suicide encoding purine nucleoside phosphorylase and thymidine kinase in human hepatocellular carcinoma cell *in vitro* [J]. *Hepatology*, 2001, 34: 511-518.
- [24] Cortes ML, Garcia-Escudero V, Hughes M, *et al.* Cyanide bystander effect of the linamarase/linamarin killer-suicide gene therapy system[J]. *J Gene Med*, 2002, 4: 407-414.

[收稿日期] 2002 - 12 - 20

[修回日期] 2003 - 03 - 28